

Cara uji mikrobiologi - Bagian 2: Penentuan *Salmonella* pada produk perikanan



© BSN 2006

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	ii
Pendahuluan	iii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Media dan pereaksi	2
6 Preparasi contoh	3
7 Prosedur	3
8 Keamanan dan keselamatan kerja	11
Lampiran A (normatif) Pembuatan media	13
Lampiran B (normatif) Pembuatan pereaksi	20
Lampiran C (informatif) Skema penentuan <i>Salmonella</i>	22
Bibliografi	23
Tabel 1 Berat contoh yang diambil yang akan diuji	3
Tabel 2 Reaksi biokimia <i>Salmonella</i> pada TSI dan LIA	5
Tabel 3 Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella</i>	8
Tabel 4 Kriteria untuk pemisahan kultur non <i>Salmonella</i>	11

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Metode pengujian ini merupakan revisi dari SNI 01-2335-1991, *Standar metode pengujian mikrobiologi-Produk perikanan penentuan Salmonella*, dirumuskan oleh Panitia Teknis Perikanan melalui rapat-rapat teknis, rapat prakonsensus dan rapat konsensus nasional pada tanggal 18 Maret 2005 di Jakarta. Dihadiri oleh wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah :

- 1 Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 21/MEN/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Data verifikasi metoda pengujian *Salmonella* laboratorium mikrobiologi BPPMHP 2003.

Pendahuluan

Perubahan yang terjadi dalam standar ini adalah sebagai berikut:

1 Pembuatan media dan pereaksi

Meskipun media dan pereaksi yang digunakan untuk pengujian banyak tersedia secara komersial, namun pencantuman pembuatan media dan pereaksi ini diharapkan akan lebih mempermudah analisis dalam menyiapkan media dan pereaksi yang tidak tersedia dipasaran.

2 Penggunaan media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) dan *Tetrathionate Broth* (TTB).

Sebelumnya, RV *medium* hanya direkomendasikan untuk pengujian udang. Hasil studi pre kolaboratif dan kolaboratif yang dilakukan oleh FDA menunjukkan bahwa RV *medium* sesuai untuk menganalisa makanan mentah, makanan dengan tingkat kontaminasi tinggi, dan makanan ternak. Data-data pendukung lain menunjukkan bahwa RV *medium* dapat menggantikan penggunaan media *Selenite Cystine Broth* untuk menganalisa semua jenis makanan. Penggunaan *Tetrathionate Broth* tetap dilakukan sebagai media pengkayaan selektif kedua. Akan tetapi, inkubasi TTB dilakukan pada 43°C untuk menganalisa makanan mentah, makanan dengan tingkat kontaminasi tinggi, dan makanan ternak; dan 35°C untuk menganalisa jenis makanan yang lain.

Hasil verifikasi metoda yang dilakukan oleh Balai Pengembangan dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan menunjukkan bahwa RV dapat direkomendasikan untuk menganalisa produk perikanan dengan tingkat kontaminasi tinggi.

3 Petunjuk pengambilan koloni dari *media agar selektif*

Petunjuk pengambilan koloni dari *media agar selektif* lebih terarah. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni terduga pada media agar selektif, disarankan untuk menginokulasi koloni yang tidak khas ke dalam media TSI dan LIA. Hal ini berdasarkan kenyataan bahwa 4% kultur *Salmonella* yang diisolasi oleh analisis FDA dari makanan tertentu terutama makanan dari laut/*seafoods* selama beberapa tahun menunjukkan koloni yang tidak khas.



Cara uji mikrobiologi - Bagian 2: Penentuan *Salmonella* pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk mendeteksi, mengisolasi dan mengkonfirmasi bakteri *Salmonella* pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

inkubasi

pengkondisian mikroorganisma untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan suhu dan waktu yang diperlukan

2.2

media pengkayaan

media yang digunakan untuk memperbaiki sel-sel bakteri yang rusak atau meningkatkan jumlah populasi bakteri

2.3

media selektif

media yang mengandung bahan-bahan selektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri selain bakteri yang dianalisa

2.4

media agar

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisma

2.5

mikroorganisma

kelompok organisma yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat di bawah mikroskop

2.6

produk perikanan

ikan termasuk biota perairan yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir lainnya berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.7

produk perikanan dengan tingkat kontaminasi tinggi

produk perikanan yang mempunyai kecenderungan banyak mengandung bakteri karena sifat produk tersebut sesuai bagi bakteri untuk tumbuh dan berkembang biak

2.8

Salmonella

bakteri Gram-negatif, berbentuk batang tanpa spora dengan ukuran $0,7\mu\text{m} - 1,5\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$. *Salmonella* umumnya memiliki *peritrichous flagella*, kecuali *Salmonella pullorum* dan *Salmonella gallinarum*

2.9

koloni terduga (*suspected colonies*)

koloni-koloni pada media agar selektif yang memberikan ciri-ciri *Salmonella* yang khas. Koloni-koloni ini harus dikonfirmasi untuk meyakinkan benar tidaknya *Salmonella*

3 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan kemudian dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* (*suspected colonies*) pada media selektif diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella*.

4 Peralatan

- Blender beserta *Jar* yang dapat disterilisasi atau *stomacher* beserta plastik steril
- Pipet
- *Petridish* ukuran 15 mm x 100 mm
- Tabung reaksi ukuran 16 mm x 150 mm dan 20 mm x 150 mm
- Rak tabung reaksi
- Timbangan dengan ketelitian 0,1 g
- Inkubator 35°C ± 1°C
- Inkubator 37°C ± 0,5°C
- *Waterbath* 43°C ± 0,2°C
- *Waterbath* 42°C ± 0,2°C
- *Waterbath* 48°C - 50°C
- Jarum inokulasi
- *Autoclave*
- Alat pengocok (*Vortex mixer*)
- *Bunsen*
- pH meter
- *Spatula*
- *Filter apparatus*
- *Oven*
- *Hot plate* dan *stirer*

5 Media dan pereaksi

- *Bismuth sulfite Agar* (BSA) (A.1)
- *Brain Heart Infusion Broth* (A.2)
- *Hectoen Enteric* (HE) *Agar* (A.3)
- *Lactose Broth* (A.4)
- *Lysine Decarboxylase Broth* (A.5)
- *Lysine Iron Agar* (LIA) (A.6)
- *Malonate Broth* (A.7)
- *Motility Test Medium* (A.8)
- *MR-VP Broth* (A.9)
- *Phenol red Carbohydrate Broth* (A.10)
- *Potasium Cyanide* (KCN) *Broth* (A.11)
- *Purple Carbohydrate Broth* (A.12)
- *Rappaport-Vassiliadis* (RV) *medium* (A.13)

- *Selenite Cystine Broth* (SCB) (A.14)
- *Simmon Citrate Agar* (A.15)
- *Tetrathionate Broth* (TTB) (A.16)
- *Triple Sugar Iron* (TSI) *Agar* (A.17)
- *Trypticase Soy –Tryptose Broth* (A.18)
- *Tryptone (Tryptophane) Broth* (A.19)
- *Urea Broth* (A.20)
- *Urea Broth (Rapid)* (A.21)
- *Xylose Lysine Desoxycholate* (XLD) *Agar* (A.22)
- *Aquadest*
- *Ethanol 70%*
- Larutan *Brilliant Green Dye* (B.1)
- Larutan *Formalized Physiological Saline* (B.2)
- *Reagen Kovac's* (B.3)
- Indikator *Methyl Red* (B.4)
- Larutan *Physiological Saline 0,85%* (B.5)
- Larutan *Potassium Hydroxide 40 %* (B.6)
- *Reagen VP* (B.7)
- Larutan *1 N Sodium Hydroxide* (B.8)
- Larutan *1 N Hydrochloric Acid* (B.9)
- *Salmonella Polyvalent Somatic O Antiserum*
- *Salmonella Polyvalent Flagellar H Antiserum*

CATATAN Tata cara pembuatan media diuraikan dalam Lampiran A dan tatacara pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran B

6 Preparasi contoh

Dengan menerapkan teknik aseptis, contoh diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai ketentuan pada Tabel 1.

Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisa. Pelelehan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2°C - 5°C atau dibawah 45°C dan tidak lebih dari 15 menit.

Tabel 1 Berat contoh yang diambil yang akan diuji

Berat contoh	Berat contoh yang akan diuji
< 1 kg atau 1 l	100 g atau 100 ml
1 kg atau 1 l - 4,5 kg atau 4,5 l	300 g atau 300 ml
> 4,5 kg atau 4,5 l	500 g atau 500 ml

7 Prosedur

7.1 Pra pengkayaan

a) Metoda ini didasarkan pada analisa 25 g atau 25 ml contoh dengan perbandingan 1 : 9 untuk contoh dan media pengkayaan. Jika pengujian dilakukan secara komposit, tambahkan media pengkayaan yang cukup untuk menjaga perbandingan 1:9.

a) Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 l sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 l timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 ml dari

contoh yang akan diuji, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 ml larutan *Lactose Broth*.

b) Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 l timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 ml, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 450 ml larutan *Lactose Broth*.

c) Homogenkan contoh selama 2 menit untuk dianalisa. Secara aseptis, pindahkan larutan contoh dalam wadah steril yang sesuai dan biarkan pada suhu ruang selama 60 menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan bila perlu tentukan pH sampai $(6,8 \pm 0,2)$. Kocok rata dan kendurkan tutup wadah secukupnya. Inkubasi 24 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Lanjutkan pengujian sesuai dengan prosedur.

7.2 Pengkayaan

a) Kencangkan tutup wadah dan kocok perlahan contoh yang diinkubasi. Untuk produk perikanan dengan tingkat kontaminasi tinggi, pindahkan 0,1 ml larutan contoh ke dalam 10 ml *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* dan 1 ml larutan contoh ke dalam 10 ml *Tetrathionate Broth (TTB)*; Untuk jenis produk perikanan lain, pindahkan 1 ml larutan contoh ke dalam masing-masing 10 ml SCB dan 10 ml TTB.

b) Inkubasi media pengkayaan selektif sebagai berikut:
Untuk produk perikanan dengan tingkat kontaminasi tinggi, inkubasi RV *medium* selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu $42^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (*Water bath*); Inkubasi TTB selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu $43^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (*Water bath*); Untuk jenis produk perikanan lain, inkubasi TTB dan SCB selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7.3 Isolasi *Salmonella*

7.3.1 Kocok tabung (dengan vortex) dan dengan menggunakan jarum loop (3mm) gores TTB yang diinkubasi ke dalam media HE, XLD dan BSA. Siapkan BSA sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang

7.3.2 Gores ke dalam media yang sama dari RV *Broth* atau SCB.

7.3.3 Inkubasi cawan BSA, HE dan XLD selama 24 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7.3.4 Amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*

7.3.4.1 Pengamatan morfologi koloni *Salmonella* yang khas (*typical*)

Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dari masing-masing media *Agar* selektif setelah 24 jam \pm 2 jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* yang khas (*typical*) adalah sebagai berikut:

- HE *Agar*. Koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- XLD *Agar*. Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- BSA. Koloni coklat, abu-abu atau hitam; kadang-kadang metalik. Biasanya media di sekitar koloni pada awalnya berwarna coklat, kemudian berubah menjadi hitam (*halo*

effect) dengan makin lamanya waktu inkubasi. Apabila koloni yang khas (*typical*) tumbuh pada BSA setelah 24 jam \pm 2 jam inkubasi, ambil 2 koloni atau lebih. Inkubasikan kembali media BSA selama 24 jam \pm 2 jam. Setelah 48 jam \pm 2 jam, ambil 2 atau lebih koloni yang khas (*typical*) yang tumbuh pada media BSA. Pengambilan ini dilakukan hanya bila koloni yang tumbuh pada media BSA yang diinkubasi selama 24 jam \pm 2 jam memberikan reaksi yang tidak sesuai pada TSI dan LIA, yang menjadikan kultur ini dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Lihat pasal 7.3.6 dan 7.3.7 di bawah untuk keterangan lebih lanjut dalam menginterpretasikan reaksi TSI dan LIA.

7.3.4.2 Pengamatan morfologi koloni *Salmonella* yang tidak khas (*typical*)

Ciri-ciri koloni *Salmonella* yang tidak khas adalah sebagai berikut:

- HE dan XLD Agar; Beberapa kultur *Salmonella* membentuk koloni berwarna kuning dengan atau tanpa inti hitam. Jika tidak ada koloni khas yang tumbuh pada media HE dan XLD setelah inkubasi 24 jam \pm 2 jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas.
- BSA; Koloni yang tidak khas membentuk koloni berwarna hijau dengan sedikit atau tanpa warna kehitaman di sekitar media. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni terduga pada media BSA setelah inkubasi 24 jam \pm 2 jam, jangan mengambil koloni, tapi inkubasi kembali media selama 24 jam \pm 2 jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi 48 jam \pm 2 jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas.

7.3.5 Ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dengan menggunakan jarum inokulasi steril dan goreskan ke permukaan media TSI agar dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menggores media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine Decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloninya pada suhu 5°C – 8°C.

7.3.6 Inkubasi TSI dan LIA selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C \pm 1°C dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi *alkalin* (merah) pada goresan agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi *alkaline* (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat diskolorisasi pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk H₂S pada LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA. Reaksi TSI dan LIA dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini:

Tabel 2 Reaksi biokimia *Salmonella* pada TSI dan LIA

Media	Agar Miring (goresan)	Agar Tegak (tusukan)	H ₂ S
TSI	<i>Alkalin/K</i> (merah)	Asam/A (kuning)	+/-
LIA	<i>Alkalin/ K</i> (ungu)	<i>Alkalin/ K</i> (ungu)	+/- ^a

^a umumnya kultur *Salmonella* membentuk H₂S pada LIA

7.3.7 Semua kultur yang memberikan reaksi *alkalin* pada tusukan agar tegak LIA, tanpa memperhatikan reaksi TSI, harus dipertimbangkan sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan agar

tegak LIA dan *alkalin* pada agar miring serta asam pada tusukan agar tegak TSI harus juga dipertimbangkan sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan agar tegak LIA dan asam baik pada goresan agar miring dan tusukan agar tegak pada TSI, dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Lakukan pengujian biokimia dan serologi terhadap kultur presumtif-positif TSI sesuai 7.3.8 untuk menentukan adanya *Salmonella* termasuk *Salmonella arizonae*. Bila kultur TSI tidak memberikan reaksi typical *Salmonella* (*alkalin* pada goresan agar miring dan asam pada tusukan agar tegak), ambil koloni terduga tambahan lainnya dari cawan media selektif dan goreskan ke permukaan media TSI dan LIA sesuai 7.3.5.

7.3.8 Lakukan uji biokimia dan serologi terhadap:

- a) Tiga kultur presumtif-positif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang digoreskan dari SCB (atau RV *Broth*. untuk produk perikanan dengan tingkat kontaminasi tinggi) jika ada, dan tiga kultur presumtif-positif TSI dari media selektif yang digoreskan dari TTB jika ada.
- b) Jika tiga kultur presumtif-positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji kultur presumtif-positif TSI yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap contoh yang dianalisa.

7.4 Identifikasi *Salmonella*

7.4.1 Kultur campuran

Apabila kultur pada TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media HE atau XLD agar. Inkubasi selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C \pm 1°C. Amati koloni yang diduga *Salmonella*:

- a) HE agar; Koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) XLD agar; Koloni merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam. Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA seperti pada butir 7.3. dan lanjutkan seperti pada butir 7.3g.

7.4.2 Kultur murni

Uji *Urease* dapat dilakukan dengan salah satu cara sebagai berikut:

- a) Uji *urease* (konvensional).
Pindahkan 1 ose penuh dari masing-masing presumtif positif TSI Agar miring ke dalam *Urea Broth*. Inkubasikan selama 24 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C \pm 1°C.
- b) Uji *urease* (cepat)
Pindahkan 1 ose dari masing-masing presumtif positif TSI Agar miring ke dalam *Rapid Urea Broth*. Inkubasikan selama 2 jam dalam *water bath* pada suhu 37°C \pm 0,5°C. Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji *Urease* memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

7.4.3 Uji serologi *Polyvalent Flagellar* (H)

- a) Uji ini dapat juga dilakukan setelah uji biokimia seperti yang diuraikan pada butir 7.4.4.

Pindahkan 1 ose dari masing-masing TSI Agar yang memberikan reaksi *Urease* negatif kedalam:

- 5 ml BHI *Broth*, dan inkubasi selama 4 jam - 6 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sampai terlihat pertumbuhan. Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized Physiological Saline* ke dalam BHI *Broth* (untuk diuji pada hari yang sama atau
 - 5 ml *tryticase soy -Tryptose Broth* (TSTB) dan inkubasi selama 24 jam ± 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized Physiological Saline* ke dalam TSTB (untuk diuji pada hari berikutnya).
- b) Siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized Physiological Saline* dan uji dengan *Salmonella Polyvalent Flagellar* (H) *antisera*. Masukkan $\pm 0,5$ ml larutan *Salmonella Polyvalent Flagellar* (H) *antisera* dalam tabung serologi 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji (butir 1 dan 2). Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 ml *formanilized Physiological Saline* dengan 0,5 ml formalinized antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam *water bath* pada suhu $48^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya selama 1 jam.
- **Positif** apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol.
 - **Negatif** apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol.
- c) Perlakuan terhadap kultur yang memberikan hasil uji *serologi flagellar* (H) negatif. Bila reaksi biokimia dari kultur *serologi flagellar* (H) negatif menunjukkan bahwa kultur tersebut adalah *Salmonella*, penggumpalan flagellar (H) negatif mungkin disebabkan karena organisme nonmotil atau karena kurang cukupnya perkembangan antigen flagellar. Perlakukan kultur sebagai berikut: inokulasi *Motility Test Medium* dalam petridish dengan menggunakan koloni yang tumbuh pada TSI miring. Inokulasi dengan cara menusuk media sekali sekitar 10 mm dari bagian tepi cawan sedalam 2 mm - 3 mm. Jangan menusuk sampai dasar cawan atau menginokulasi bagian yang lain. Inkubasi selama 24 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Bila organisme berpindah sejauh 40 mm atau lebih lakukan uji ulang sebagai berikut:
- inokulasi dengan menggunakan jarum inokulasi sejumlah pertumbuhan terjauh ke dalam *Trypticase Soy-Tryptose Broth*.
 - ulangi pengujian *Polyvalent Flagellar* (H), bila tidak terjadi pergerakan setelah 24 jam pertama, inkubasi kembali selama 24 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; bila masih tidak bergerak inkubasi sampai 5 hari pada suhu 25°C .
 - nyatakan kultur sebagai tidak bergerak (*nonmotile*) bila semua uji di atas masih tetap negatif, bila kultur memberikan reaksi flagellar (H) negatif tetapi memberikan reaksi biokimia positif, kirim kultur untuk diuji serotyping.

7.4.4 Pengujian kultur *Urease* negatif

a) LDB

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Pindahkan 1 ose dari TSI ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama 48 jam ± 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* memberikan reaksi *alkalin* ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu, tambahkan beberapa tetes 0,2% *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

b) *Phenol red dulcitol* atau *purple Broth* base dengan 0,5% dulcitol
Pindahkan 1 ose dari TSI ke dalam media *dulcitol Broth*. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C \pm 1°C, tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c) TB

Pindahkan 1 ose dari TSI ke dalam media *Tryptone Broth*. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C \pm 1°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:

- Potasium Cyanida (KCN) *Broth*

Pindahkan 1 ose dari TB 24 jam ke dalam media KCN *Broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C \pm 1°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini yang ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- *Malonate Broth*

Pindahkan 1 ose dari TB 24 jam ke dalam media *Malonate Broth*. Inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu 35°C \pm 1°C, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate Broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate Broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *Broth* ini.

- Uji *Indol*

Pindahkan 5 ml TB 24 jam ke dalam tabung kosong dan tambahkan 0,2 ml – 0,3 ml *Reagent kovacs*'. Amati segera setelah penambahan *Reagen*. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara *orange* dan *pink* dinyatakan sebagai \pm .

Tabel 3 Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella*

No.	Pengujian	Hasil Reaksi		<i>Salmonella</i> Reaksi spesies ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2.	<i>Lysine Decarboxylase</i> (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
4.	<i>Urease</i>	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine Decarboxylase Broth</i> (LDB)	Warna ungu	Warna kuning	+
6.	<i>Phenol red Dulcitol Broth</i>	Warna kuning dan/ atau gas	Tidak ada pembentukan gas dan tidak terjadi perubahan warna	+ ^b
7.	KCN <i>Broth</i>	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	—

Tabel 3 (Lanjutan)

No.	Pengujian	Hasil Reaksi		<i>Salmonella</i> Reaksi spesies ^a
		Positif	Negatif	
8.	<i>Malonate Broth</i>	Warna biru	Tidak ada perubahan warna	— ^c
9.	Uji <i>Indol</i>	Warna violet pada permukaan	Warna kuning pada permukaan	—
10.	Uji serologi <i>Polyvalent Flagellar</i> (H)	Penggumpalan	Tidak ada penggumpalan	+
11.	Uji serologi <i>Polyvalent Somatic</i> (O)	Penggumpalan	Tidak ada penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose Broth</i>	Warna kuning dan/ atau gas	Tidak ada pembentukan gas dan tidak terjadi perubahan warna	— ^c
13.	<i>Phenol red sucrose Broth</i>	Warna kuning dan/ atau gas	Tidak ada pembentukan gas dan tidak terjadi perubahan warna	—
14.	Uji Voges Proskauer	Merah muda sampai merah	Tidak ada perubahan warna	—
15.	Uji <i>Methyl Red</i>	Warna Merah menyebar	Warna kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	Ada pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan tidak ada perubahan warna	V
Dengan: ^a +, 90% atau lebih positif dalam 1 atau 2 hari; —, 90% atau lebih negatif dalam 1 atau 2 hari; v, variabel ^b Mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : Negatif ^c Mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : Positif				

- Uji serologi *Polyvalent Flagellar* (H)
Jika uji serologi *Polyvalent Flagellar* (H) belum dilakukan, maka pengujian pada butir 7.4.3 dapat dilakukan pada tahap ini.
- Nyatakan kultur sebagai **bukan** *Salmonella* bila reaksi *Indol* dan flagellar (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif.

7.4.5 Uji serologi *Polyvalent Somatic* (O)

Ambil 1 ose kultur dari TSI (dari butir 8.3f) yang telah diinkubasikan selama 24 jam – 48 jam dan letakkan diatas gelas preparat, kemudian tetesi dengan larutan saline 0,85% steril dan emulsikan. Letakkan 1 tetes *Salmonella Polyvalent Somatic* (O) *Antiserum* disamping suspensi koloni. Campurkan koloni *Antiserum* sedikit demi sedikit dengan suspensi koloni sampai tercampur sempurna. Lakukan kontrol dengan menggunakan larutan saline dan *Antiserum*. Miringkan campuran tersebut ke kiri dan ke kanan, dan amati segera pada latar belakang yang gelap. Amati hasil uji sebagai berikut:

Positif apabila terjadi penggumpalan pada larutan kultur dan tidak terjadi penggumpalan pada larutan kontrol.

Negatif apabila tidak terjadi penggumpalan baik pada larutan kultur maupun larutan kontrol.

7.4.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel 3 butir 1 – 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap contoh yang diuji menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji *serologi flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada butir 7.4.1 diatas dan uji kembali mulai pada butir 7.4.2. Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel 3:

a) *Phenol red lactose* atau *purple Lactose Broth*.

- Pindahkan 1 ose dari TSI Agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam – 48 jam kedalam *phenol red lactose* atau *purple Lactose Broth*. Inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam.
Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromcresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- Nyatakan sebagai **bukan** *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan agar tegak TSI dan reaksi *alkalin* pada tusukan agar tegak LIA, atau reaksi positif pada *Malonate Broth*.

b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose Broth*.

- Pindahkan 1 ose dari TSI Agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam – 48 jam kedalam *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose Broth*. Inkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam.
Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromcresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- Nyatakan sebagai **bukan** *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi *sucrose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan agar tegak TSI dan reaksi *alkalin* pada LIA.

c) *Methyl Red - Voges-Proskauer* (MR – VP) *Broth*

Pindahkan 1 ose dari TSI Agar miring ke dalam media *MR-VP Broth* dan inkubasikan selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut:
Pindahkan 1 ml *MR-VP Broth* yang telah diinkubasi selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali *MR-VP Broth* selama 48 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ untuk pengujian *Methyl Red*. Tambahkan 0,6 ml *Alpha Alphanaphtol* dan kocok. Tambahkan 0,2 ml larutan 40% KOH dan kocok kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin, dan amati hasilnya setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah muda *eosin* sampai merah mirah delima (*ruby*) pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi VP negatif.

- Uji *Methyl Red* (MR)
 Tambahkan 5 tetes - 6 tetes indikator *Methyl Red* kedalam media MR - VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Amati hasilnya dengan segera. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.
 Nyatakan sebagai **bukan** *Salmonella* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) *Simmons citrate Agar*

Pindahkan 1 ose dari TSI *Agar* miring kedalam media *Simmon Citrate Agar* miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama 96 jam \pm 2 jam pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Positif, apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil *citrate* positif.

Negatif, apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

Tabel 4 Kriteria untuk pemisahan kultur non *Salmonella*

No.	Pengujian	Hasil
1.	<i>Urease</i>	Positif (warna ungu sampai merah)
2.	Uji <i>Indol</i> dan <i>Polyvalent Flagellar</i> (H)	Positif (warna merah pada permukaan) Negatif (tidak ada penggumpalan)
3.	<i>Lysine Decarboxylase</i> dan <i>KCN Broth</i>	Negatif (warna kuning) Positif (ada pertumbuhan)
4.	<i>Phenol red lactose Broth</i>	Positif (warna kuning dan/ atau gas) ^{a,b}
5.	<i>Phenol red sucrose Broth</i>	Positif (warna kuning dan atau gas) ^b
6.	Uji <i>Voges- Proskauer</i> Uji <i>Methyl Red</i>	Positif (merah muda sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)
Dengan: ^a Uji <i>Malonate Broth</i> positif lebih lanjut untuk menentukan jika biakan tersebut <i>Salmonella arizonae</i> . Lakukan uji <i>Malonate Broth</i> untuk menentukan adanya <i>Salmonella arizonae</i> ^b Jangan membuang kultur <i>Broth</i> yang positif jika LIA menunjukkan reaksi <i>Salmonella</i> yang khas; lakukan pengujian lebih lanjut untuk menentukan adanya bakteri <i>Salmonella</i> .		

7.4.7 Pelaporan

Apabila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari butir 7.4.4 terhadap kultur TSI lain yang memberikan reaksi *Urease* negatif dari contoh yang sama.

Laporkan sebagai ***Salmonella*** kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel 3
 Laporkan sebagai **bukan *Salmonella*** kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel 4

8 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- a Gunakan jas laboratorium selama melakukan analisa;

- b Lakukan analisa di dalam laminar air flow;
- c Jangan menyedot pipet dengan mulut;
- d Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisa;
- e Bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfectan;
- f Media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dicuci;
- g Jangan membuka *Autoclave* setelah melakukan sterilisasi sebelum alat penunjuk tekanan udara mencapai titik terendah.



Lampiran A (normatif)

Pembuatan media

A.1 *Bismuth sulfite Agar*

<i>PolyPeptone</i> (atau <i>Peptone</i>)	10 g
<i>Beef extract</i>	5 g
<i>Dextrose</i>	5 g
Na_2HPO_4 (kering)	4 g
FeSO_4 (kering)	0,3 g
<i>Bismuth sulfite</i> (indicator)	8 g
<i>Brilliant green</i>	0,025 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dan panaskan dengan pengadukan. Didihkan selama 1 menit untuk mendapatkan suspensi homogen. Dinginkan sampai suhu 45°C - 50°C . Tuang sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri. Biarkan hingga kering selama 2 jam dengan cara membuka sedikit tutup cawan petri, kemudian tutup. pH akhir $7,7 \pm 0,2$. **Jangan di Autoclave**. Siapkan media ini 1 hari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap. Selektifitas akan menurun dalam waktu 48 jam.

A.2 *Brain Heart Infusion (BHI) Broth*

<i>Calf brain infusion</i>	200 g
<i>Beef heart infusion</i>	250 g
<i>Proteose Peptone</i> atau <i>gelysate</i>	10 g
NaCl	5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,5 g
<i>Dextrose</i>	2 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dalam *Aquadest* dan panaskan perlahan-lahan. Masukkan ke dalam botol atau tabung untuk disimpan. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir $7,4 \pm 0,1$. Untuk persiapan *BHI Agar*, tambahkan 15 g agar ke dalam 1 liter *BHI Broth*. Panaskan untuk melarutkan agar sebelum dimasukkan ke dalam botol atau labu. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir $7,2 \pm 0,1$.

A.3 *Hektoen Enteric (HE) Agar*

<i>Peptone</i>	12 g	<i>Sodium thiosulphate</i>	5 g
<i>Yeast extract</i>	3 g	<i>Ferric ammonium citrate</i>	1,5 g
<i>Bile salts no. 3</i>	9 g	NaCl	5 g
<i>Lactose</i>	12 g	<i>Bromthymol blue</i>	0,065 g
<i>Sucrose</i>	12 g	<i>Agar</i>	14,0 g
<i>Salicin</i>	2 g	<i>Acid fuchsin</i>	0,1 g
NaCl	5 g	<i>Aquadest</i>	1 liter

Panaskan sampai mendidih sambil diaduk. Didihkan tidak lebih dari 1 menit. Jangan terlalu panas. Dinginkan dalam *water bath*. Tuang sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri steril. Biarkan kering selama 2 jam dengan cara membuka sedikit tutup cawan petri. pH akhir $7,5 \pm 0,2$. Jangan menyimpan media ini lebih dari 1 hari.

A.4 Lactose Broth

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Lactose	5 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dan sterilisasi pada suhu 121°C 15 menit. pH akhir $6,9 \pm 0,2$.

A.5 Lysine Decarboxylase Broth

Gelysate atau Peptone	5 g
Yeast extract	3 g
Glucose	1 g
L-lysine	5 g
Bromcresol purple	0,02 g
Aquadest	1 liter

Panaskan hingga semua bahan larut. Pipet sebanyak 5 ml ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tutup tabung dikendurkan. Kencangkan tutup tabung selama penyimpanan dan sesudah inokulasi. pH akhir $6,8 \pm 0,2$.

A.6 Lysine Iron Agar (LIA)

Gelysate atau Peptone	5 g
Yeast extract	3 g
Glucose	1 g
L-lysine hydrochloride	10 g
Ferric ammonium citrate	0,5 g
Sodium thiosulphate (kering)	0,04 g
Bromcresol purple	0,02 g
Agar	15 g
Aquadest	1 liter

Panaskan hingga semua bahan larut. Pipet sebanyak 7.5 ml ke dalam tabung bertutup. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 12 menit. pH akhir $6,7 \pm 0,2$. Setelah sterilisasi miringkan tabung untuk memperoleh bagian agar miring (*slant*) dan tusukan (*butt*).

A.7 Malonate Broth

Yeast extract	1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
K_2HPO_4	0,6 g
KH_2PO_4	0,4 g
NaCl	2 g
Sodium malonate	3 g
Dextrose	0,25 g

<i>Bromthymol blue</i>	0,025 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dengan pemanasan jika perlu. Pipet sebanyak 3 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir $6,7 \pm 0,2$.

A.8 *Motility Test Medium (Semisolid)*

<i>Beef extract</i>	3 g
<i>Peptone</i> atau <i>gelysate</i>	10 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Agar</i>	4 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Panaskan sambil diaduk dan didihkan selama 1 – 2 menit untuk melarutkan agar. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan sampai 45°C. Tuang sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri steril, tutup dan biarkan kering. Gunakan pada hari yang sama setelah dibuat. pH akhir $7,4 \pm 0,2$.

A.9 *MR-VP Broth*

Medium 1

<i>Buffered Peptone-water powder</i>	7 g
<i>Glucose</i>	5 g
<i>K₂HPO₄</i>	5 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Medium 2

<i>Pancreatic digest of casein</i>	3,5 g
<i>Peptic digest of animal tissue</i>	3,5 g
<i>Dextrose</i>	5 g
<i>Potassium phosphate</i>	5 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam *Aquadest*, panaskan bila perlu. Tuang sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi dan *Autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. PH akhir $6,9 \pm 0,2$.

A.10 *Phenol red Carbohydrate Broth*

<i>Trypticase</i> atau <i>Proteose Peptone</i> No. 3	10 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Beef extract</i> (pilihan)	1 g
<i>Phenol red</i> (7,2 ml larutan <i>phenol red</i> 0,25 %)	0,02 g
<i>Aquadest</i>	1 liter
<i>Carbohydrate</i> *	

* Larutkan baik 5 g *dulcitol*, 10 g *lactose*, atau 10 g *sucrose* (seperti yang disebutkan dalam uji *Salmonella*) dalam media *basal* ini. Pipet sebanyak 2,5 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi *durham*. Sterilisasi pada suhu 118°C selama 10 menit. pH akhir $7,4 \pm 0,2$. Alternatif lain, larutkan semua bahan kecuali *Carbohydrate* ke dalam 800 ml *Aquadest* dan panaskan sambil sesekali diaduk. Pipet sebanyak 2 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi *durham*.

Sterilisasi pada suhu 118°C selama 15 menit dan biarkan dingin. Larutkan *Carbohydrate* dalam 200 ml *Aquadest* dan steril filter. Secara aseptis, tambahkan 0,5 ml *Carbohydrate* steril kedalam tabung media *basal* steril. Kocok agar tercampur. pH akhir $7,4 \pm 0,2$.

A.11 *Potassium cyanide (KCN) Broth*

<i>Potassium cyanide</i>	0,5 g
<i>Protease Peptone</i> No. 3 atau <i>PolyPeptone</i>	3 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	0,225 g
Na_2HPO_4	5,64 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan (kecuali *potassium cyanide*) dan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dan simpan pada suhu 5°C-8°C. pH akhir $7,6 \pm 0,2$. Siapkan larutan KCN stock dengan cara melarutkan 0,5 g KCN kedalam 100 ml *Aquadest* steril, dinginkan hingga suhu 5°C-8°C. Dengan menggunakan pipet bulb, tambahkan 15 ml larutan KCN stock kedalam 1 liter media *basal* steril dingin. **Jangan dipipet dengan mulut.** Kocok dan pindahkan sebanyak 1-1,5 ml ke dalam tabung steril dan tutup dengan *paraffin*. Media ini dapat disimpan pada suhu 5°C-8°C, selama 2 minggu sebelum digunakan.

A.12 *Purple Carbohydrate Broth*

<i>Protease Peptone</i> No. 3	10 g
<i>Beef extract</i>	1 g
NaCl	5 g
<i>Bromcresol purple</i>	0,02 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Siapkan seperti pada *Phenol red Carbohydrate Broth* (M11). pH akhir $6,8 \pm 0,2$.

A.13 *Rappaport-Vassiliadis Medium*

Medium basal

<i>Tryptone</i>	5 g
NaCl	8 g
KH_2PO_4	1,6 g
<i>Aquadest</i>	liter

Larutan magnesium chlorida

$\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutan Malachite green oxalate

<i>Malachite green oxalate</i>	0,4 g
<i>Aquadest</i>	100 ml

Siapkan larutan tersebut diatas dengan perbandingan 1000 ml larutan *basal*, 100 ml larutan *magnesium chlorida* dan 10 ml larutan malachite green (total volume 1110 ml). Larutan *basal* harus disiapkan pada hari yang sama dan dicampur dengan larutan lainnya.

Larutan magnesium chlorida dapat disimpan dalam botol gelap pada temperatur ruang hingga 1 tahun. Untuk menyiapkan larutan ini, larutkan $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dalam wadah tertutup karena garam ini sangat higroskopis.

Larutan *Malachite green oxalate* dapat disimpan dalam botol gelap pada suhu ruang hingga 6 bulan.

Masukan sebanyak 10 ml ke dalam tabung 16 mm x 150 mm. *Autoclave* selama 15 menit pada suhu 115°C . pH akhir $5,5 \pm 0,2$. Simpan dalam refrigerator dan gunakan dalam waktu 1 bulan

Media ini harus dibuat dari masing-masing bahan. Penggunaan media komersial tidak disarankan, dan sebaiknya memperhatikan formula dan suhu inkubasi yang digunakan.

A.14 *Selenite Cystine Broth*

<i>Tryptone</i> atau <i>PolyPeptone</i>	5 g
<i>Lactose</i>	4 g
<i>Sodium acid selenite</i> (NaHSO_4)	4 g
Na_2HPO_4	10 g
L – <i>Cystine</i>	0,01 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Panaskan sampai mendidih agar melarut. Tuang sebanyak 10 ml kedalam tabung reaksi steril. Panaska 10 menit dalam uap panas. **Jangan di *Autoclave*.** pH akhir $7,0 \pm 0,2$. Media ini tidak steril. Gunakan pada hari yang sama.

A.15 *Simmons citrate Agar*

<i>Sodium citrate</i>	2 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	1 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
MgSO_4	0,2 g
<i>Bromthymol blue</i>	0,08 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan bahan-bahan dan panaskan selama 1 menit – 2 menit sampai agar terlarut. Tuang kedalam tabung reaksi. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15. Miringkan tabung dengan kemiringan 4 cm - 5 cm sebelum media menjadi padat. pH akhir $6,8 \pm 0,2$.

A.16 *Tetrathionate Broth*

Tetrathionate Broth basal

<i>Poly Peptone</i>	5 g
<i>Bile salts</i>	1 g
<i>Calcium carbonate</i>	10 g
<i>Sodium thiosulfate</i> $5\text{H}_2\text{O}$	30 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter *Aquadest*, campur, dan panaskan hingga mendidih. **Jangan di *Autoclave*.** (Bahan tidak semuanya terlarut). Dinginkan sampai kurang dari 45°C . simpan pada suhu 5°C - 8°C . pH akhir $8,4 \pm 0,2$.

Larutan Iodine-Potassium iodide (I₂-KI)

Potassium iodide	5
Iodine, resublimed	6 g
Aquadest steril	20 ml

Larutkan *Potassium iodide* dalam 5 ml *Aquadest* steril. Tambahkan iodine dan aduk agar melarut. Larutkan sampai 20 ml.

Larutan Brilliant green

Brilliant green dye steril	0,1 g
Aquadest steril	100 ml

Pada saat digunakan, tambahkan 20 ml larutan I₂-KI dan 10 ml larutan *Brilliant green* kedalam 1 liter *basal*. Aduk agar semua bahan tercampur dan tuang sebanyak 10 ml kedalam tabung reaksi steril. Jangan memanaskan media setelah penambahan larutan I₂-KI dan larutan *Brilliant green*.

A.17 Triple Sugar Iron (TSI) AgarMedia 1

PolyPeptone	20 g
NaCl	5 g
Laktose	10 g
Sucrose	10 g
Glucose	1 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0,2 g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,2 g
Phenol red	0,025 g
Agar	13 g
Aquadest	1 liter
Phenol red	0,024 g
Aquadest	1 liter

Media 2

Beef extract	3 g
Yeast extract	3 g
Peptone	15 g
Proteose Peptone	5 g
Glucose	1 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
FeSO ₄	0,2 g
NaCl	5 g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,3 g
Agar	12 g

Kedua media dapat ditukar untuk keperluan umum. Larutkan semua bahan Media 1 dalam 1 liter *Aquadest* dan panaskan sambil sesekali diaduk. Didihkan selama 1 menit agar semua bahan terlarut. hingga mendidih. Sterilisasi media pada suhu 118°C selama 15 menit. Siapkan media 2 seperti pada media 1, kecuali sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum media menjadi padat, miringkan tabung agar memperoleh agar miring 4 cm - 5 cm dan agar dasar 2 cm - 3 cm pH akhir 7,3 ± 0.2 (Media 1) dan 7,4 ± 0.2 (Media 2).

A.18 Trypticase Soy – Tryptose Broth

Trypticase Soy Broth	15 g
Tryptose Broth	13.5 g
Yeast extract	3 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dalam 1 liter *Aquadest* dengan sedikit pemanasan. Tuang sebanyak 5 ml kedalam tabung reaksi. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,2 ± 0,2.

A.19 Tryptone (Tryptophane) Broth 1%

<i>Tryptone</i> atau <i>Trypticase</i>	10 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dan pindahkan sebanyak 5 ml tabung reaksi. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15. pH akhir $6,9 \pm 0,2$.

A. 20 Urea Broth

<i>Urea</i>	20 g
<i>Yeast extract</i>	0,1 g
Na_2HPO_4	9,5 g
K_2HPO_4	9,1 g
<i>Phenol red</i>	0,01 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dalam 1 liter *Aquadest*. **Jangan dipanaskan.** Sterilisasi menggunakan membran filter $0,45 \mu\text{m}$. Pindahkan 0,1 ml -3,0 ml ke dalam tabung steril. pH akhir $6,8 \pm 0,2$.

A.21 Urea Broth (Rapid)

<i>Urea</i>	20 g
<i>Yeast extract</i>	0,1 g
Na_2HPO_4	0,095 g
KH_2PO_4	0,091 g
<i>Phenol red</i>	0,01 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan dalam 1 liter *Aquadest*. **Jangan dipanaskan.** Sterilisasi menggunakan membran filter $0,45 \mu\text{m}$. Pindahkan 0,1 ml -3,0 ml ke dalam tabung steril. pH akhir $6,8 \pm 0,2$.

A.22 Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

<i>Yeast extract</i>	3 g
<i>Ferric ammonium citrate</i>	0,8 g
<i>L-lysine</i>	5 g
<i>Sodium thiosulfate</i>	6,8
<i>Xylose</i>	3,75 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Lactose</i>	7,5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Sucrose</i>	7,5 g
<i>Phenol red</i>	0,08 g
<i>Sodium dextrocholate</i>	2,5 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan semua bahan hingga mendidih dalam erlenmeyer steril. Jangan di *Autoclave*. Tuang ke dalam cawan petri. Tunggu sampai kering dengan cara membuka sedikit tutup cawan petri, pH akhir $7,4 \pm 0,2$.

Lampiran B (normatif)

Pembuatan pereaksi

B.1 Larutan *Brilliant green Dye*, 1%

<i>Brilliant green dye</i>	1 g
<i>Aquadest</i> steril	10 ml

Larutkan *Brilliant green dye* dalam *Aquadest* steril.

B.2 Larutan Formalinized *Physiological Saline*

Larutan <i>formaldehyde</i>	6 ml
NaCl	8,5 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan 8,5 g NaCl dalam 1 liter *Aquadest*. Sterilisasikan pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan pada temperatur ruang. Tambahkan 6 ml larutan *formaldehyde*. Jangan di *Autoclave* setelah penambahan *formaldehyde*.

B.3 Reagen Kovacs'

<i>P</i> - <i>Dimethylaminobenzaldehyde</i>	5 g
Amyl alcoho (normal)	75 ml
HCl (pekat)	25 ml

Larutkan *P*-*Dimethylaminobenzaldehyde* dalam amyl *Alcohol* normal. Tambahkan HCl perlahan-lahan. Simpan pada suhu 4°C. Untuk uji *Indol*, tambahkan 0,2 ml – 0,3 ml *Reagen* kedalam 5 ml kultur *Tryptone Broth* yang diinkubasi 24 jam. Terbentuknya cincin merah pada permukaan menunjukkan hasil yang positif.

B.4 Indikator *Methyl Red*

<i>Methyl Red</i>	0,10 g
<i>Ethanol</i> , 95%	300 ml
<i>Aquadest</i> untuk membuat 500 ml larutan	

Larutkan *Methyl Red* dalam 300 ml *Ethanol*. Tepatkan volumenya hingga 500 ml dengan *Aquadest*.

B.5 Larutan *Physiological Saline* 0,85%

NaCl	8,5 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan 8,5 g NaCl dalam *Aquadest*. Sterilisasikan pada suhu 121°C selama 15 menit.

B.6 Larutan *Potassium hydroxide*, 40 %

KOH	40 g
<i>Aquadest</i>	100 ml

Larutkan KOH dalam *Aquadest*.

B.7 Reagen VPLarutan 1

<i>Alpha-Alphanaphtol</i>	5 g
<i>Alcohol (absolut)</i>	100 ml

Larutan 2

<i>Potassium hydroxide</i>	40 g
<i>Aquadest</i>	100 ml

Uji VP. Pindahkan 1 ml kultur 48 jam kedalam tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml larutan 1 dan 0,2 ml larutan 2. Kocok setelah penambahan larutan. Untuk mempercepat reaksi, tambahkan kristal *creatine* kedalam campuran larutan. Biarkan pada suhu ruang. Baca hasilnya setelah 4 jam. Pembentukan warna *eosin* pink menunjukkan hasil yang positif.

B.8 Larutan 1 N *Sodium Hydroxide* Solution

NaOH	40 g
<i>Aquadest</i>	100 ml

Larutkan NaOH dalam *Aquadest*.

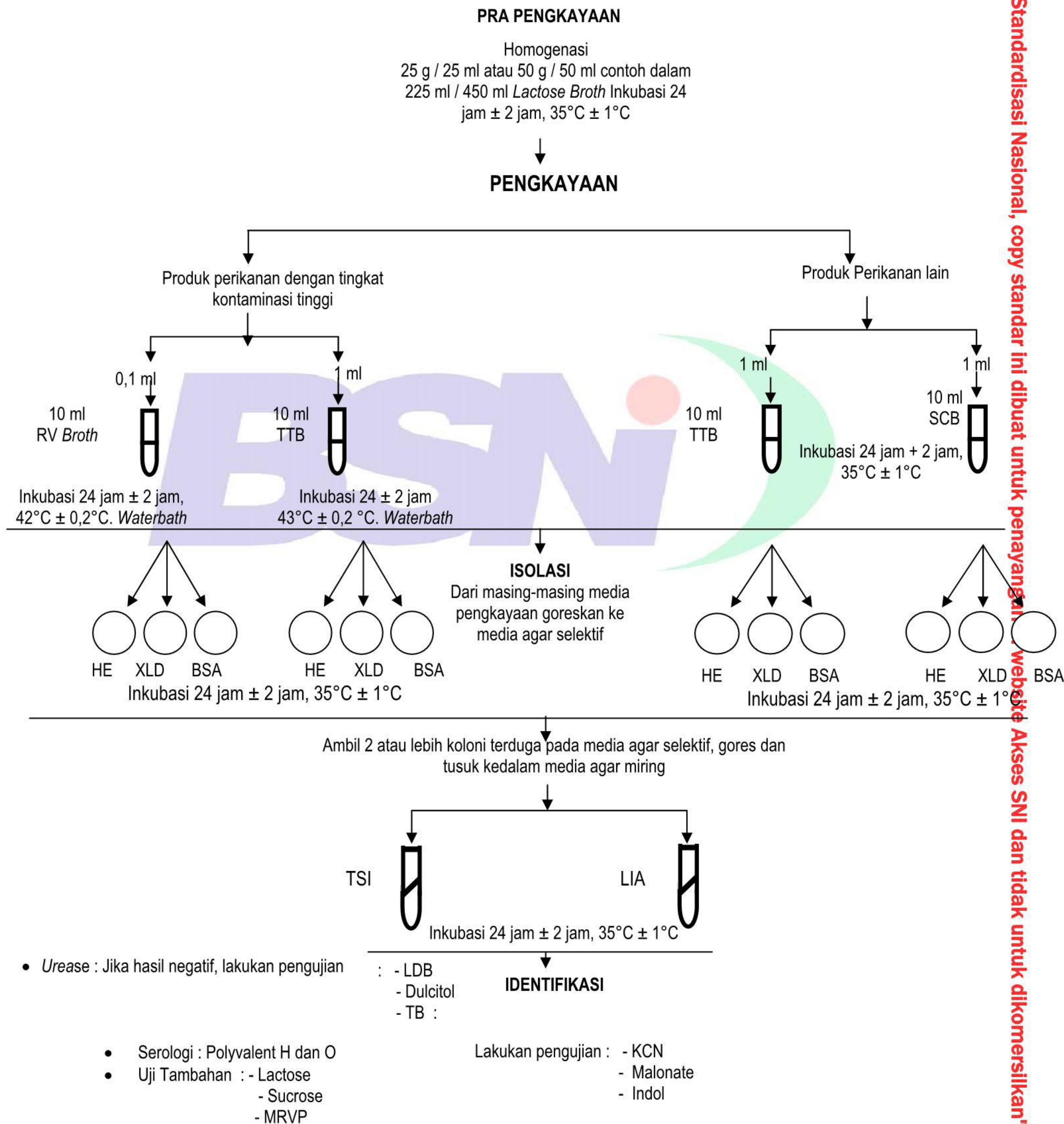
B.9 Larutan 1 N *Hydrochloric Acid*

HCl	89 g
<i>Aquadest</i>	1 liter

Larutkan HCl dalam *Aquadest*.

Lampiran C (Informatif)

Skema penentuan *Salmonella*



Bibliografi

Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual. 8th edition, 1998. Chapter 5. AOAC International

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 1998. 8th edition.









BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id